

# 核多角体病ウイルス感染蚕における体液中の $\alpha$ -ケトグルタル酸および遊離アミノ酸の濃度変化

誌名	日本蠶絲學雜誌
ISSN	00372455
巻/号	522
掲載ページ	p. 172-176
発行年月	1983年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 核多角体病ウイルス感染蚕における体液中の $\alpha$ -ケト グルタル酸および遊離アミノ酸の濃度変化

黒田 秧<sup>1)</sup>・渡部 仁<sup>2)</sup>

- 1) 茨城県谷田部町・農水省蚕糸試験場 (〒305)
- 2) 文京区弥生・東京大学農学部 (〒113)

(1982年11月20日 受領)

SHIGERU KURODA\* and HITOSHI WATANABE\*\* : Changes in the concentration of  $\alpha$ -ketoglutaric acid and free amino acids in haemolymph of the silkworm *Bombyx mori*, infected with a nuclear-polyhedrosis virus

Changes in the concentration of  $\alpha$ -ketoglutaric acid ( $\alpha$ -KG) and free amino acids in the haemolymph were investigated on the female silkworm larvae, *Bombyx mori*, during the course of nuclear polyhedrosis in the 5th instar. A marked increase in  $\alpha$ -KG concentration was recognized on the 4th to 5th days after virus inoculation. On the other hand, the concentration of most free amino acids in the haemolymph such as methionine, isoleucine, arginine, proline, and valine, etc., increased significantly on the 4th day postinoculation and, on the following day, the majority of amino acids turned decrease in the concentration. Whereas some other amino acid concentrations continued to increase. Thus, a remarkable change in both  $\alpha$ -KG and amino acid concentrations in the larval haemolymph took place at a late stage of virus infection when the diseased haemolymph was turned white in colour by polyhedron formation.

(\*Sericultural Experiment Station, Yatabe, Ibaraki 305 ; \*\*Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113)

核多角体病ウイルス(NPV)を5齢24時間目の雌幼虫に接種し、体液中の $\alpha$ -ケトグルタル酸( $\alpha$ -KG)および各種遊離アミノ酸の濃度を経時的に調べた。体液が多角体により乳白色を呈し始めた接種96時間目には、 $\alpha$ -KG濃度は急増し、体液が顕著に白濁した感染末期の120時間目には、対照区よりも著しく高いレベルとなった。一方、遊離アミノ酸濃度も接種96時間目に多数のアミノ酸で急増し、特にメチオニン、イソロイシン、アルギニン、プロリンおよびバリンの各濃度値は対照区のそれの4倍以上を示した。しかし、120時間目には更に濃度の増加するアミノ酸もみられたが、多くのアミノ酸濃度は減少に転じた。以上のように、NPV感染蚕における体液中の $\alpha$ -KG濃度の増大と遊離アミノ酸濃度の激変は、病徴が明らかとなる感染後期に同時に起こることが認められた。

$\alpha$ -ケトグルタル酸( $\alpha$ -KG)はトリカルボン酸回路のメンバーであり、炭水化物代謝とアミノ酸代謝との分岐点に位置し、かつ多くのアミノ基転移反応にも関与するなど、生理的に重要な機能をもつ有機酸である。カイコ幼虫の体液中の $\alpha$ -KG濃度は、摂食期間中はほぼ定常値を示すが、そのレベルには品種間で差異があり、飼育時期の違いや給餌量制限によっても変化すること、また保存品種の幼虫集団における体液および個体全体の $\alpha$ -KG濃度にも個体変

異が存在し、体重の重い個体ほど濃度が低いことなどが明らかにされている(黒田, 1979 a~d)。これらの知見は、 $\alpha$ -KG濃度が遺伝的並びに環境的な要因に影響を受ける可能性を示すものであり、特に環境変化による発育の良否と $\alpha$ -KG濃度との間には相関関係が存在することを示唆している。

本報では、体内環境の変化として核多角体病ウイルス(NPV)の感染を取り上げ、感染蚕の病態に伴う体液中の $\alpha$ -KG濃度と遊離アミノ酸濃度の変化

について調査を行い、これら体液成分の変化と発病時期との関係を中心に検討した。以下結果の概要を述べる。

#### 材料と方法

桑葉育した日124号×支124号の5齢雌幼虫を供試した。NPVは東京大学農学部養蚕学研究室の保存系統を用いたが、その多角体浮遊液を塗布した桑葉を4齢1日目の幼虫に与え、3日後に病徴の現われ

た個体から採血し、滅菌蒸留水で20倍に希釈した後遠心分離(3000rpm, 5分間)によって上清分画を得た。このウイルス液をエーテルで麻酔した5齢24時間目の幼虫120個体の第1腹脚の基部に1個体当たり3 $\mu$ lを接種した。また同一時期の幼虫に対して正常蚕の体液の20倍希釈液を同様な方法で注射した個体群を対照区とした。両実験区とも各120個体を5:7に分割し、前者を死亡率と体重の測定に当て、後者からは経時的に10個体を採り個体別に50 $\mu$ lの

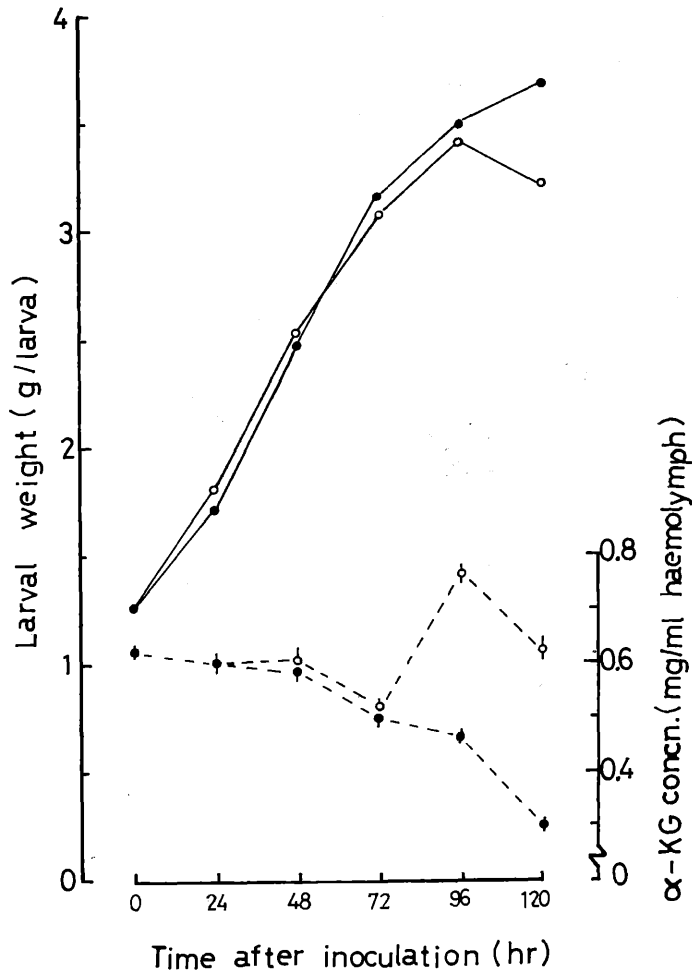


Fig. 1. Changes in the body weight (solid line) and  $\alpha$ -ketoglutaric acid concentration in the haemolymph (dotted line) during the 5th instar of the control (healthy, ●) and the virus-inoculated (○) larvae. Virus was inoculated on the 2nd day of the 5th instar. Vertical bars indicate the standard error.

体液を採取した。なお、両実験区で麻酔の覚醒時期が多少異なったため、処理時間を含めて5時間絶食させた後に給桑した。

体液試料の調製は、体液 50 $\mu$ l に対して4%のメチルサリチル酸溶液を1ml加え、遠心分離(0°C, 3500 rpm, 20分間)の後、上清分画より0.5mlを分取し、大倉ら(1971)の方法によって $\alpha$ -KG濃度

の吸光度定量を行った。さらに、上清分画の残りの部分を10検体分集め、1mlを分取し、これに0.25Nクエン酸リチウム溶液(pH2.2)を3ml加えてアミノ酸分析試料とした。遊離アミノ酸の定量は、アミノ酸自動分析計(日本電子, JLC-6AH)を使用し、リチウム緩衝液による溶出法(Gamo *et al.*, 1978)によって行った。

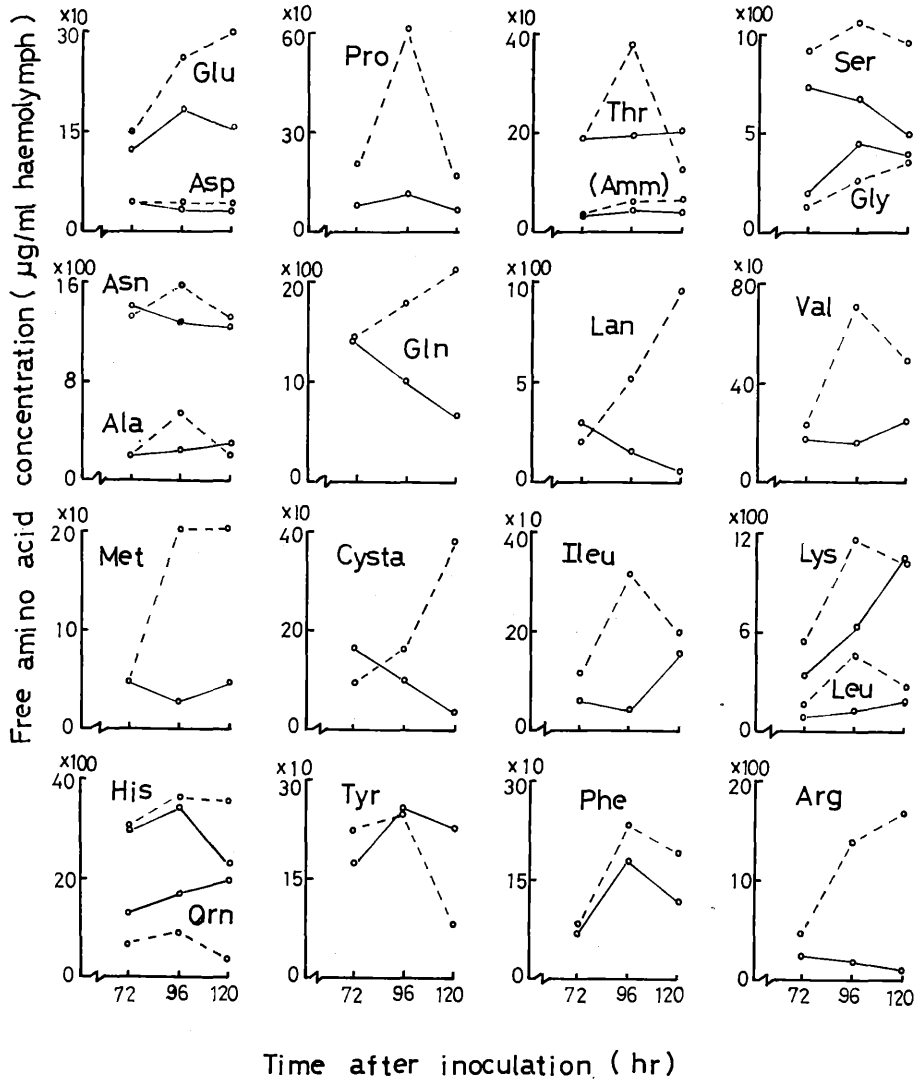


Fig.2. Changes in the free amino acids concentration in the haemolymph during the 5th instar of the control (solid line) and the virus-inoculated (dotted line) larvae. Virus was inoculated on the 2nd day of the 5th instar.

## 結 果

5 齢24時間目毎に測定した NPV 接種蚕および対照蚕の体重と体液  $\alpha$ -KG 濃度の変化を Fig. 1 に示す。NPV 接種蚕の体重は、接種後96時間目まで対照蚕と同傾向で増加したが、120 時間目に体重は急激に減少した。多角体形成に伴う体液の白濁は、72 時間目までは認められなかったが、96時間目に体液はわずかに乳白色を呈し、120 時間目には顕著な白濁が観察され、接種個体の4%が死亡した。なお、120 時間目の対照蚕の死亡率は0%であり、この時期は吐糸開始1日前に相当した。さらに接種後120時間から144時間目の間に、接種個体は100%致死した。

一方、体液  $\alpha$ -KG 濃度は、NPV 接種後72時間目までは対照蚕よりもわずかに高い濃度であったが、96時間目に顕著に増加し、対照蚕の約1.7倍の濃度を示した。さらに120時間目の  $\alpha$ -KG 濃度は、両区とも減少する傾向を示したが、NPV 接種蚕の  $\alpha$ -KG 濃度は対照蚕よりも依然として約1.7倍高かった。これらの結果から、NPV 接種蚕では病徴の発現に伴って体液中の  $\alpha$ -KG 濃度が異常に高くなることは明らかであり、またその  $\alpha$ -KG 濃度の著しい上昇は体重の減少よりも1日前、すなわち体液が多角体によって白濁し始める時期に特異的に起こることが認められる。

次に、 $\alpha$ -KG 濃度が急増した接種96時間目を中心に、体液中の遊離アミノ酸の定量分析の結果を Fig. 2 に示す。NPV 接種蚕の72時間目の分析値を対照蚕と比較すると、大多数の遊離アミノ酸濃度は差異がないが、プロリン、イソロイシン、ロイシンおよびアルギニンの濃度が約2倍高く、オルニチン濃度は逆に約1/2であった。体液が白濁し始める96時間目になると、接種蚕の大多数の遊離アミノ酸が対照蚕よりも極めて高い濃度を示した。特にメチオニンとイソロイシンが対照蚕の8倍、アルギニンが7倍、プロリンが5倍、バリンとイソロイシンが4倍の濃度を示したのに対して、オルニチンとグリシンは対照蚕の約1/2の濃度を示した。明瞭な病徴が現われた接種後120時間目になると、数種のアミノ酸では対照蚕の濃度レベルかそれ以下まで低下した。しかしながら、グルタミン酸、グルタミン、ランチオニン、シスタチオニンおよびアルギニンは連続的な濃度増加を示した。

以上の結果を総括すれば、NPV 感染蚕の体液では多角体による白濁化が起こる時期に、 $\alpha$ -KG 濃度の急激な上昇が現われるとともに、数種の遊離アミノ酸の濃度は増加を続ける一方で、多数の遊離アミノ酸では濃度が増加後急減するように、遊離アミノ酸濃度の著しい変化が起こることである。

## 考 察

本研究結果から、NPV 感染蚕の体液中の  $\alpha$ -KG や多数の遊離アミノ酸の濃度は、多角体によって体液が白濁し始め病徴が現われ始める時期以降に激変することが明らかになった。これまで、NPV に感染した昆虫におけるアミノ酸代謝の病態生理に関しては、*Peridroma saucia* の終齢幼虫において、接種6日目（死亡1日前頃）に脂肪組織のグルタミン酸-オキザロ酢酸アミノ基転移酵素（GOT）およびグルタミン酸-ピルビン酸アミノ基転移酵素（GPT）の活性が対照区よりも高く、体液中のケト酸、とりわけ  $\alpha$ -KG の吸収スペクトルも対照区に比較して50%増加すること（Van der Geest and Craig, 1967）、また体液 GOT 活性が接種4日目以降顕著に高まり、死亡1日前の6日目には対照区の8倍の活性を示すことが報告されている（Martignoni and Milstead, 1967）。ところで、GOT および GPT 反応は、いずれも  $\alpha$ -KG が直接的に関与した反応であるので、 $\alpha$ -KG の測定値からこれら酵素活性を予測することも可能である。カイコでは NPV 感染とアミノ基転移反応との関係が不明であるが、本研究での  $\alpha$ -KG 濃度の結果から判断してこれら酵素活性の高いことが推察される。

NPV の感染に伴う体液中の遊離アミノ酸濃度の変化について、カイコでは大部分のアミノ酸の濃度が低下するが、アルギニン、プロリン、グルタミン酸およびメチオニンで増加することが報告されており（Kawase, 1966）、*Peridroma saucia* の幼虫でも多数のアミノ酸の濃度低下とグリシンの増加が報告されている（Van der Geest and Craig, 1967）。これに対して、数種のアミノ酸とニンヒドリン陽性物質の濃度増加をカイコで認めた報告もある（Drilhon *et al.*, 1951）。しかしながら、これらの報告は経時的な変化を調べたのではなく、病徴発現時に採血を行って得た結果である。従って、本研究で明らかにしたように、感染後期に遊離アミノ酸濃度の激

変が起ることからすれば、本質的に本研究と異なる結果でないと考えられる。

核多角体病蚕の蛋白質代謝に関連して、感染中期の体液蛋白質の電気泳動像に正常蚕とは異なった変化が現われ、易動度の低い蛋白質から高いものへと順次減少し、感染末期には蛋白質成分がさらに全般的に減少することが明らかにされている(渡部ら, 1968; 渡部・小原, 1971)。また、感染蚕ではプロテイナーゼ活性が著しく高いこと(吉原, 1950)や<sup>14</sup>C-アミノ酸の体液蛋白質へのとり込みをみた電気泳動像のオートラジオグラムから、体液蛋白質の合成能が感染中期以降低下すること(渡部・小原, 1971)も示されている。一方、<sup>3</sup>H-アミノ酸を用いた組織のオートラジオグラムから、多角体蛋白質の合成は感染末期において顕著であることが明らかにされている(Watanabe, 1967)。体液  $\alpha$ -KG 濃度の急増は接種後96時間目に起こったが、この時期は以上述べたような体液蛋白質合成の低下ならびに多角体蛋白質合成能の増大の時期と一致している。

本研究から得られた知見と上述した種々の報告から判断すると、感染後期の遊離アミノ酸の増加は体液蛋白質の合成阻害と分解によるものであり、引続く減少は多くのアミノ酸が多角体蛋白質の合成に消費されるためではないかと考えられる。また、 $\alpha$ -K

G濃度の増加はアミノ基転移酵素の活性化を反映したものと推察される。

## 文 献

- DRILHON, A., BUSNEL, R. G., and VAGO, C. (1951): *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **232**, 360-361.
- GAMO, T., KURODA, S., HORIE, Y., and WATANABE, K. (1978): *Appl. Ent. Zool.*, **13**, 223-226.
- KAWASE, S. (1966): *Appl. Ent. Zool.*, **1**, 1-4.
- 黒田 秧 (1979 a): *日蚕雑*, **48**, 71-76.
- 黒田 秧 (1979 b): *日蚕雑*, **48**, 119-122.
- 黒田 秧 (1979 c): *日蚕雑*, **48**, 177-178.
- 黒田 秧 (1979 d): *日蚕雑*, **48**, 287-290.
- MARTIGNONI, M. E., and MILSTEAD, J. E. (1967): *Ann. Ent. Soc. Amer.*, **90**, 428-431.
- 大倉洋甫・松村一彦・浜田 浩・百瀬 勉 (1971): *Japan Analyst*, **20**, 480-484.
- VAN DER GEEST, L. P. S., and CRAIG, R. (1967): *J. Invertebr. Pathol.*, **9**, 43-54.
- 渡部 仁: 小原隆三・保坂政子 (1968): *日蚕雑*, **37**, 319-322.
- 渡部 仁・小原隆三 (1971): *応動昆*, **15**, 198-202.
- WATANABE, H. (1967): *J. Invertebr. Pathol.*, **9**, 428-429.
- 吉原典子 (1950): *農化誌*, **22**, 252-254.